

당뇨병 예방을 위한 펩티드 및 유전자 치료

Peptide/Gene Therapy for the Prevention of Diabetes

박용수

한양대학교 의과대학 내과학교실

Yongsoo Park, M.D., Ph.D.

Department of Internal Medicine and Bioengineering,
School of Medicine and Engineering, Hanyang University, Seoul, Korea

책임저자 주소: 471-802 경기도 구리시 교문동 249-1

한양대학교 구리병원 내분비내과

Tel: 031-560-2239, 011-9072-2239

Fax: 02-2298-2284

E-mail: parkys@hanyang.ac.kr

Abstract

Pancreatic β cell function deteriorates continuously in type 2 diabetes patients despite optimal treatment, which has been attributed to hyperglycemia itself via formation of excess reactive oxygen species. Studies of animals with spontaneous autoimmune diabetes have revealed that autoreactive T cells that mediate islet β cell destruction can be manipulated by the administration of cytokines, especially Th2 cytokines. Restoration of self tolerance at certain time period may facilitate islet cell regeneration and may enable complete recovery from diabetes. To overcome short half-lives of cytokines, we would like to deliver genes which enable cytokine production in the body. We also induced antiapoptotic molecules in β cells, the protective effect of which we screened systematically, applying new gene/peptide delivery strategies. In this study, the effect of peptide delivery using specific carriers was evaluated both in

vitro and in vivo. In view of the immunoregulatory activity of Th2 cytokines, we investigated whether systemic or local cytokine gene therapy stops islet destructive autoimmunity and regenerates β cells of the pancreas in NOD mice. In addition, treatment of β cells with the antioxidant metallothionein resulted in a significant reduction in pathological changes and restored GSIS. Specific inhibition of NF- κ B activation by retroviral transduction of dominant negative inhibitor of NF- κ B also protected β cells. Therefore, these results suggest the protective influence of these gene/peptide delivery as an adjunctive measure to clinical islet transplantation may enable us to improve the results of the cell-based treatment to overcome the battle against the debilitating disease of diabetes mellitus.

Key Words: Peptide therapy, Gene therapy, Tat- fusion protein, Slow release growth factor delivery

서론

당뇨병은 현재 전세계적으로 약 2억 명 정도가 앓고 있을 정도로 흔한 질환으로 인식되고 있으며, 당뇨병과 관련된 합병증 및 동반질환은 인적, 사회적, 경제적 손실이 큰 중요한 보건문제중의 하나로 대두되고 있다. 우리나라에서도 예외가 아니어서, 우리나라의 건강보험 심사평가원의 최근 10년간 건강보험자료를 분석한 결과 2020년경에는 국민 7명당 1명꼴인 722만 명(전국민의 14.4%)이 당뇨병 환자가 될 것으로 추정하고 있으며, 이와 동반한 사회경제적 비용 손실도 막대할 것으로 예상되고 있다. 당뇨병의 높은 유병률, 유병기간, 경제적 손실 등을 고려할 때 예방 및 치료 방법을 개발하는 것은 매우 시급하다 할 수 있다.

제2형 당뇨병의 주요 병태생리 기전은 베타세포의 인슐린 분비능 결함과 말초에서의 인슐린 작용의 이상으로 알려져 있다. 비록 두 가지 기전의 상대적 중요성은 아직 논란 중에 있지만 최근의 많은 연구에서 췌장베타세포의 기능저하가 당뇨병(즉 혈당상승)의 좀 더 필수조건적 기전으로 받아들여지고 있다. 또한 제2형 당뇨병 환자에서 유병기간이 오래 됨에 따라 당내성이 점차 악화되는 것은 지속적인 베타세포의 기능이상과 연관이 있다고 알려져 있다.¹ 유전적인 요소는 제외한 베타세포의 지속적인 기능저하의 원인으로는 고혈당에 의해 초래되는 당독성(glucose toxicity)과 고유리지방산혈증에 의한 지질독성(lipotoxicity)이 연관되어 있다. 또한 고혈당 그 자체의 악순환(vicious cycle)이 베타세포를 손상시키고 결국엔 파괴하게 된다.^{3, 4}

당뇨병은 현재의 치료법으로는 완치할 수 없는 만성질환이며, 거의 정상에 가까운 혈당 조절만이 당뇨병성 만성 합병증을 예방할 수 있다고 보고되고 있다. 그러나 이는 근본적인 치료가 아닐뿐더러 연간 3,000번이 넘는 주사를 통한 인슐린 투여가 필요한 것으로 알려지고 있다. 이를 보완하는 치료로는 췌장이식술이 있는데 뇌사자의 공여가 가능한 췌장이 적을 뿐 아니라 이식과 관련한 면역억제제 투여에 따른 문제점이 제기되고 있다. 최근 인슐린을 분비하는 타인의 췌도만을 이식하여 인슐린 분비 기능을 회복시키는 시술에 대한 관심이 집중되고 이에 따라 성적이 호전되고 있다. 췌도이식은 췌장이식에 비해 덜 침습적이며 시술이 간편하여 시술에 따른 부작용이 적고 입원기간이 짧으며 반복시술이 가능한 장점이 있다. 또한 췌장이식이 불가능한 경우에도 췌도를 채취하여 이식하는 것이 가능하다. 그러나 췌도이식의 경우 두 사람 이상의 공여자에게서 세포를 공여 받아야 하며 분리기술이 불안정하여 분리한 세포의 최대 75% 이하만이 이식가능한 상태가 되는데, 많은 세포를 이식하여야 효과가 기대 됨에도 이식된 세포의 10~20%만이 초기에 생존하게 된다. 그렇지만 세포가 현재 많이 사용되는 Edmonton 이식법⁵을 통해 이식될 경우 혈관 속에서의 면역반응으로 인하여 초급성 혈액 매개성 염증반응으로 인하여 파괴가 되고 더욱이 두 명 이상의 공여자의 세포를 이식할 경우 서로 다른 HLA 항원으로 인하여 염증반응이 심화되어 거부반응을 초래할 가능성이 존재하게 된다. 이와 같은 소견을 종합할 때 당뇨병 환자에서 췌도세포 사멸의 기전을 알아보고 췌도이식시 세포사멸을 억

제할 수 있는 치료법의 개발 및 췌도이식 없이 대체 치료 방법의 모색은 매우 중요하다 할 수 있겠다.

본 론

1. 고혈당에 따른 췌장 베타세포의 사멸 그리고 당뇨병 발병

췌장 베타세포는 다양한 세포사멸(apoptosis) 기전을 촉진하는 자극에 민감하다. 유리지방산, 포도당, 설펜요소제 그리고 아밀린이 제2형 당뇨병의 병인으로 베타세포사멸을 유도하는 것으로 보고되고 있다. 췌장 베타세포는 인체에서 유일하게 인슐린을 합성하고 분비하는 세포로 혈당을 정상으로 유지하기 위해서는 인슐린의 지속적인 공급뿐 아니라 필요에 맞게 공급이 가능하여야 한다. 이에 따라 베타세포 기능과 베타세포량(mass)은 긴밀하게 조절되어야 하는데, 이를 위해 적절한 복제(replication), 자극 및 세포사멸 자극에 반응할 수 있는 특수한 구조와 기능을 갖고 있다. 이와 같은 기전으로 사람에서는 고혈당에 노출되었을 때 베타세포 증식(hyperplasia)와 함께 베타세포 신생(neogenesis), 복제(replication) 기전과 췌장 베타세포의 세포사멸 기전이 균형을 이루면서 베타세포 숫자를 조정하여 보상(compensate)하게 된다. 기능적으로는 glucose stimulated insulin secretion (GSIS)의 set point를 조정한다든지, 베타세포의 분화를 강화하여 보상이 일어날 수 있는 것으로 알려지고 있다.^{3, 4}

제2형 당뇨병은 베타세포 mass가 인슐린저항성을 보상할 수 있을 정도로 인슐린 분비를 증대할 수 없을 때 발생된다. 대부분의 제2형 당뇨병 동물모델에서는 베타세포의 보상이 주로 베타세포 증식에 의해 이루어진다. 사람에서 실제 베타세포 mass가 당뇨병이 출현한 뒤 점차 감소하는 것인지 분명하지 않고, 여러 연구결과에서도 제2형 당뇨병 환자에서 베타세포 mass가 정상이라는 보고와 감소되어 있다는 보고가 혼재되어 있다. 이러한 연구에서 인슐린저항성이 없는 정상 대조군과 비교할 때, 인슐린저항성을 갖고 있는 비만 환자에서는 이를 보상하기 위한 베타세포 증식이 일어나야 한다는 점을 감안하여 거의 비슷한 정도의 베타세포 mass 증가로 보일 때는 오히려 감소되어 있는 것임을 유념해야 한다.^{6, 7} Sempoux 등의 연구에서 볼 때, 인슐린으로 치료하고 있는 제2형 당뇨병 환자에서 베타세포

mass의 감소를 볼 수 있는데 이는 인슐린종을 이식받은 동물에서와 같이 지속적 인슐린 투여에 의해 고인슐린혈증이 동반된 저혈당시 베타세포 mass의 감소를 볼 수 있다는 측면에서 이해할 수 있다.⁸ 그렇지만 인슐린 치료로 베타세포 휴식을 도모할 경우 발병한 지 얼마 되지 않은 제1형 당뇨병 환자의 경우 베타세포 기능이 개선될 수 있고, 20%의 제1형 당뇨병 환자에서 인슐린이 필요하지 않은 관해상태를 지속할 수 있음을 유념해야 된다. 이와 같은 연구에서 아직 분명하게 말할 수는 없지만 감소된 베타세포 mass가 사람 제2형 당뇨병 환자에서 베타세포부전을 일으키는 중요한 요인으로 지적하고 있다. 즉 사람 제2형 당뇨병 환자에서 베타세포가 인슐린저항성의 증가를 보상하지 못하는 것은 베타세포 mass가 감소했기 때문이라고 생각된다.

동물실험에서는 좀 더 분명하게 췌장 베타세포 사멸의 증가가 제2형 당뇨병에서 관찰되는 베타세포 부전의 중요한 원인임을 밝히고 있다. 당뇨병에 이환된 Zucker fatty/fa/fa 백서의 췌도에는 대조군 보다 100배 높은 유리지방산 농도에 노출되어 있는 것으로 알려지고 있다. 그리고 당뇨병전 Zucker 백서의 소도를 유리지방산 1 mmol/L에 노출하면 세포사멸이 4배 증가하는 것이 관찰되는데 이는 sphingomyelinase 산물인 ceramide 증가에 기인함이 밝혀졌고, ceramide 생산을 저해하였더니 유리지방산에 의한 세포사멸의 증가를 억제할 수 있었다. 또 재미있게도 유리지방산은 NO 생성을 4배 증가시켰고, iNOS 발현을 증가시켰으며, iNOS 억제제 처리에 인슐린 분비 억제를 최소화할 수 있었다. 또 항사멸인자인 Bcl-2는 유리지방산에 의해 감소되었는데, 렙틴을 처리할 경우 Bcl-2 억제와 세포사멸 증가가 회복되었다. 또 설폰요소제에 ob/ob 생쥐 소도를 장기간 노출시켰을 때 calcium 의존적으로 베타세포 사멸이 일어나는 것이 알려져 있다. 그리고 생리적 농도의 포도당이 베타세포 사멸을 억제하기도 하지만, ob/ob 생쥐 소도를 고농도의 포도당 농도에 노출시켰을 때 베타세포 부전과 포도당에 반응하지 않게 되며 세포사멸이 증가한다. 이와 같은 실험실내 그리고 동물실험에서 제2형 당뇨병의 병태생리에 중요한 대사물질들이 베타세포사멸을 조장하고 또 당뇨병 치료약제들이 베타세포 사멸을 일으키는 것을 확인할 수 있다.^{3, 4, 9}

췌장 베타세포가 장기간 고농도 포도당에 노출되었을 때 인슐린 유전자에 작용하는 전사인자들의 변화로 인슐린 분비가 떨어지는 것을 포도당 독성이라 한다. 포도당 독성

의 정확한 원인은 밝혀져 있지 않으나 고농도 포도당에 노출되었을 때 세포내 자유기 (free radical)가 증가하고 이러한 자유기가 췌도 기능을 저하시킨다. 하지만 이러한 자극으로부터 췌도를 보호하는 것으로 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase 등의 항산화효소, metallothionein (MT) 1, heat shock protein 70 그리고 heme oxygenase 1 등이 있다. 췌도는 다른 조직에 비해 낮은 항산화 효소를 가지고 있으며, 고농도의 포도당 같은 스트레스 상황에서 세포내 peroxide치가 증가하고 항산화제인 heme oxygenase 1 활성도도 같이 증가함을 확인하였다. 이러한 포도당 농도의 증가는 포도당 자기산화, AGE (Advanced Glycation Endproduct) 형성, 글루코사민 경로, 및 산화성 인산화 과정에서 다양한 종류의 반응성 산소종을 생성해 내고, 당뇨병 환자에서 항산화제의 부족으로 인해 세포사멸 및 베타세포 기능 부전에 이르게 되는 일련의 기전들이 밝혀지고 있다.^{9, 10} 그렇지만 고혈당 자체가 이러한 변화를 초래하는 것인지, 조기 인슐린 투여로만 이러한 변화들이 극복되는 것인지, 다른 약제들을 사용하여 혈당을 낮추었을 때 이러한 변화들이 회복될 수 있는 것인지 분명하지 않지만, 설폰요소제 사용에 비해 메트포르민, 치아졸리딘디온 사용후 이러한 변화가 극복되는 것이 실험실내 연구로 증명되어 있다.¹¹⁻¹³

2. 단백질 전달기술

단백질 전달 기술은 펩티드, 단백질 및 핵산을 세포 내로 전달하기 위한 방법으로 최근 활발히 연구되고 있는 기술이다. 단백질과 펩티드 같은 생물학적 활성을 지닌 물질의 효과를 극대화하고 세포질이나 특정기관에서 그 활성을 발휘시키기 위해 이들은 세포 안으로 효율적으로 전달될 필요성이 있다. 그러나 인지질 이중층으로 되어 있는 세포막은 단백질, 핵산과 같은 수용성 거대분자의 세포내 투과를 방해한다. 본 연구에 사용한 단백질 전달 기술은 약물이 지질이중막(lipid bilayer) 구조를 가지는 세포막을 안정적으로 통과하도록 약물에 단백질 전달체라 불리는 짧은 펩티드를 이용한 것이다. 본 연구팀은 항산화 효과가 널리 알려진 물질에 단백질 전달 기술을 이용하여 약물의 효과를 극대화시킬 수 있는지 방법을 찾아 보고자 하였다.

1) Reactive oxygen species (ROS)

Reactive oxygen species (ROS)란 산소이온이나 유리

기 또는 과산화물을 총칭하는 말로써, 분자 내에 존재하는 최외각 전자의 불안정함 때문에 반응성이 매우 높다. 이러한 ROS는 생체 내에서 일어나는 일반적인 호흡과 염증 반응 동안에 흔히 급속 촉매 반응에서 생성되며 세포 신호전달에 중요한 작용을 한다고 알려져 있다.^{14, 15} ROS는 높은 산화성으로 DNA, 단백질 등 세포 구성 성분에 손상을 준다. 또한 자외선이나 열에 노출되는 환경적인 스트레스가 반복이 되면 ROS의 수준이 급격히 증가할 수 있으며, 이는 세포의 구조에 막대한 피해를 입힐 수 있다.¹⁴⁻¹⁷ 이것을 산화 스트레스라고 부르며, 파킨슨씨 병이나 치매 같은 신경성 퇴행질환이나 당뇨병 및 당뇨 합병증에서도 중요한 병인으로 여겨지고 있다.^{14-16, 18} 특히 당뇨병에서 ROS의 과잉생성은 당뇨성 혈관 합병증 발생과 당뇨성 신증의 중요한 요소 중 하나이다. 또한 고혈당 상태에서 여러 종류의 세포에서 ROS가 과잉생성 될 가능성이 있다고 보고되고 있다. 무엇보다도 ROS는 췌장 베타세포의 기능장애를 가져온다고 알려져 있다(Fig. 1).¹⁹⁻²¹

2) 미토콘드리아와 ROS

미토콘드리아의 대사과정에서 산소분자는 ATP 생성 과정 동안 포도당과 다른 기질의 완전한 대사에 필수적이다. 그러나 정상적인 산화성 인산화 과정중에 소모되는 산소의 0.4~4%는 free radical superoxide로 바뀐다. 결국 이는 다른 반응성 산소기와 반응성 질소기로 바뀔 수 있다. 유리기 과산화물은 정상적으로 항산화성 방어과정에 의해 제거

된다. 미토콘드리아 내 과산화물은 superoxide dismutase에 의해 빠르게 과산화수소로 바뀐다. 그 후 과산화수소는 미토콘드리아 내 glutathione peroxidase에 의해 물과 산소로 약독화 되거나 세포질내로 확산되어 peroxisome 내에서 catalase에 의해 약독화 된다. 그러나 구리와 철과 같은 환원된 전이 금속이 있는 상태에서 과산화수소는 반응성이 높은 수산화기로 바뀔 수 있다. 과도한 반응성 산소기는 세포 구성성분에 손상을 준다. 그래서 내재적 항산화성 시스템이 반응성 산소기를 중화하기 위해 세포내에 존재하고, 이들 시스템은 적절한 세포기능을 유지하는데 중요하다. 주된 세포 항산화제는 glutathione (GSH)과 환원된 NADP이다. 내재적 항산화성 단계가 세포의 redox balance를 복구할만한 충분한 보상성 반응을 야기하는데 실패할 경우 GSH는 감소하고 산화성 스트레스가 발생한다. 위와 같은 반응에 의해 생성되는 대부분의 ROS는 미토콘드리아에서 생성되며 제거하는 역할 역시 미토콘드리아 내의 효소에 의해 이루어진다. 세포내에서 특히 ROS와 밀접한 관련이 있는 미토콘드리아를 타겟으로 약물전달을 함으로써 약물의 효과를 극대화 시킬 수 있다.

3) 당뇨병에서의 ROS

제1형 당뇨병에서 ROS는 베타세포의 사멸을 유도한다고 알려져 있다.²² 또 제2형 당뇨병에서는 고혈당 상태가 지속되면서 체내에서의 산화 스트레스는 계속해서 증가하게 된다. 고혈당 상태에서는 반응성 산소기의 상승과 함께, 항산화능의 감소가 일어난다. Glutathione redox system, Vit C-Vit E cycle, α -lipoic acid/dihydrolipoic acid redox pair 등을 포함한 중요한 세포 내 항산화 방어기전의 감소는 당뇨병 환자에 있어 산화성 자극에 대한 민감도를 증가시킨다. 고혈당이 신병증, 망막병증, 신경병증, 대혈관과 미세혈관병증을 포함하는 당뇨병의 많은 주된 합병증을 야기한다는 것은 잘 알려져 있는 사실이다. 고혈당이 증가됨에 따라 ROS의 생성이 증가하여 인슐린 저항성을 악화시키고, 조직에 손상을 일으키며, 나아가 심혈관 질환이나 신장 및 안구질환 같은 당뇨병성 합병증을 유발한다.¹⁹⁻²¹ 조절되지 않는 당뇨병에서는 superoxide radical을 불활성화시키는 superoxide dismutase 및 항산화성 비타민 E, α -lipoic acid가 감소된다. 즉 ROS 생성의 증가는 제1형, 제2형 당뇨병 모두에서 특히 베타세포의 사멸을 유도함으로써 당뇨병 및 합병증의 발병을 촉진하고, 악화시키는 것으로

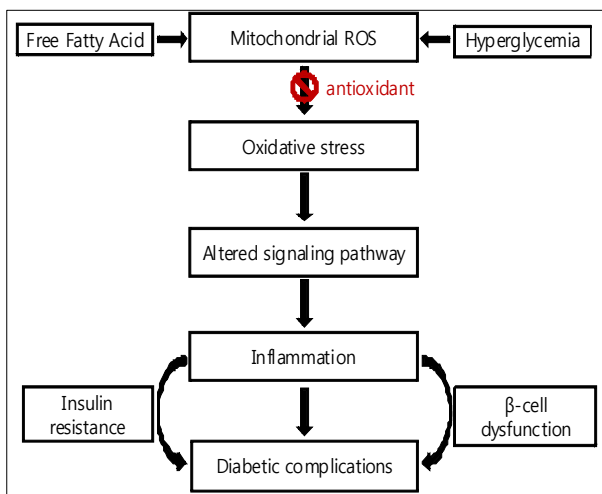


Fig. 1. Oxidative stress and development of β cell dysfunction and insulin resistance.

알려져 있다.

4) 당뇨병에서 항산화제의 효과

ROS는 제1형 당뇨병에서 베타세포의 파괴를 야기하며, 항산화제의 처리는 베타세포의 생존에 이롭다는 연구가 보고되어 있다.¹⁹ 항산화제의 과발현을 통해 당뇨병에서 생성되는 ROS의 독성을 개선시킬 수 있고,^{22, 23} systemic하게 투여하는 것 또한 제1형 당뇨병의 발병시기를 늦출 수 있다는 연구결과도 있다.^{24, 25} 실제로 당뇨병 환자에게 산화 스트레스 의존성 세포 내 변화를 감소시키기 위해 Vit C, Vit E, α -lipoic acid 등의 항산화 약물을 투여하기도 한다. 뿐만 아니라 제1형 당뇨병의 치료 방법중 하나인 췌도이식에서도 항산화제를 처리함으로써 이식 후에 소도의 생존률을 증가시킬 수 있다는 연구결과도 있다.²⁶⁻²⁸ 최근 한 연구팀에서는 베타세포에 특이적으로 thioredoxin을 과발현시킴으로써 당뇨병 동물모델인 NOD mouse에서 베타세포 손상으로 부터 현저한 보호효과를 확인하였다.²⁹

5) 항산화제로서의 Metallothionein (MT)

Metallothionein은 1957년 최초로 발견되었으며, cysteine이 풍부한 저분자(3.5~14 kDa) 물질이다. MT는 금속 독성에 대한 생체 방어의 중요한 수단으로 생각되어져 왔으며, 또한 산화성 스트레스에 대한 방어 작용도 하는 것으로도 알려져 있다.³⁰ 흔히 ROS의 산화성 손상에 대한 생물학적 방어는 ROS를 제거하는 단백질들, 금속이온을 격리시키는 분자들 및 손상된 세포 구성성분을 복구하는 효소들로 구성되어 있다.³⁰ 이 중 MT는 지금까지 많은 연구를 통해 산화성 스트레스에 대한 세포반응에서 항산화제 역할을 한다는 것이 증명되어 왔다.^{31, 32} 하지만 대부분의 연구는 MT를 유전자재조합을 통해 세포나 체내에서 과발현시켜 효과를 확인하였는데, 이는 MT가 세포막의 지질이중막구조를 통과하기 어렵다는 한계점을 가지고 있기 때문이다. 그렇지만 유전자 과발현을 위한 바이러스 투여가 생체 내에서는 제한점을 가지므로 다른 치료가 필요하게 되었다.

6) Transactivator of transcription (Tat)

Tat은 HIV 바이러스에 있는 한 부분으로, 단백질 형질도입 도메인 (PTD; protein transduction domain) 이라고 불린다. Tat은 외부 단백질의 세포내 유입을 돕기 위해 사용되고 있으며, 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

1988년에 Tat 단백질의 세포막 투과능에 대해 처음 보고되었고, 그 후에 특정 단백질을 Tat 단백질에 유전자 재조합 또는 화학적으로 융합시켜 형질도입에 이용한 연구가 진행되었다. Tat 단백질의 86개 아미노산 서열은 서로 기능이 중복되는 부분을 포함하고 있으나, 최근에 Dowdy 등은 박테리아 발현시스템에 기초해 Tat 단백질의 47~58번 아미노산 잔기와 특정 단백질을 융합시킨 유전자재조합 융합 단백질을 개발하였다.³³ 이 펩티드는 아르기닌이 많이 포함된 Tat 단백질의 한 부분이며, 형질 도입을 위해 필요한 최소 단위의 아미노산 서열이다.^{33, 34} Tat 융합 단백질이 세포 배양액에 첨가되면, 세포 안으로 침투되고 신호서열에 의해 핵에 축적된다. 이때 세포로의 유입 정도는 세포의 종류와 농도, 처리시간에 따라 달라진다.³⁵ 항원성 단백질을 Tat에 융합시킨 연구에서, Tat-항원 융합체는 항원전달세포에 의해 처리된 후 항원 특이적 세포독성 T 림프구에 의해 표적세포를 효과적으로 사멸하는 결과를 얻은 보고가 있다.^{36, 37} 또한 Tat 펩티드와 형광 FITC를 융합시켜 복막에 주입한 결과, 모든 혈액과 비장세포, 뇌와 근육에 효과적으로 전달되는 것을 확인한 결과도 보고되었다.³⁴ Tat은 췌도이식에도 이용되며, 췌도세포의 생존력을 개선시킬 수 있을 것으로 여겨진다.³⁸

7) Mitochondrial targeting sequence (MTS)

세포질내 사립체 전달을 용이하기 위한 mitochondrial targeting sequence (MTS)는 양친매성 알파 헬릭스 구조를 형성하는 잠재력을 가지고 있는 21~60개의 아미노산 잔기를 의미한다. MTS는 대개 pre-단백질의 아미노 말단에서 발견되며, MTS를 갖는 단백질은 미토콘드리아의 막을 통과할 수 있다고 알려져 있다(Fig. 2).^{35, 39}

3. 성공적인 췌도이식을 위한 TGFB 서방형 국소 분비 체계 및 PRP gel

임상적으로 췌도이식은 제1형 당뇨병의 현존하는 가장 중요한 근치술이다. 그렇지만 장기 공여자의 부족 및 면역학적 거부 현상으로 인해 흔히 시술되기에는 극복해야 될 장애가 많다. 실제로 1990년부터 1997년까지 200여 건의 췌도이식이 시행되었으나 1년간의 완치율은 8%에 지나지 않았다. 그렇지만 2000년 7월 캐나다 알버타 대학의 경우 Edmonton protocol의 도입으로, 7명의 이식 환자에서 평균 1년간 완치율이 100%에 달하여 획기적인 성적의 진보

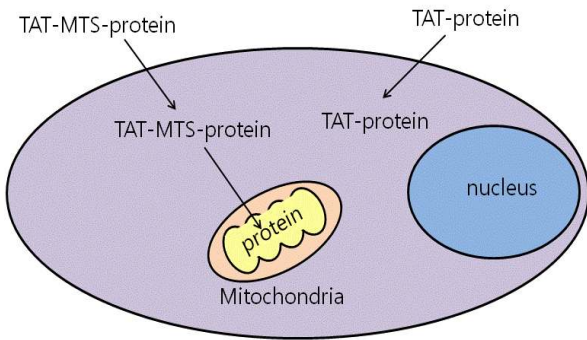


Fig. 2. Schematic presentation of the delivery applying TAT-protein and TAT-MTS-protein.

를 보고한 바 있다.⁵ 이렇게 괄목할 만한 이식 성공률의 증가를 이룬 요인들을 보면 다음과 같다. 첫째, 충분한 양의 췌도 공급이 가능해졌다(6,000 IEq/kg에서 약 12,000 IEq/kg로). 둘째, 면역억제제 배합의 개선(rapamycin + 저용량 FK506+anti-IL2 antibody)이 이루어졌다. 셋째, 췌도 분리 후 즉시 이식이 중요하다고 보고했으나, 최근에는 췌도 분리 후 배양한 뒤 이식하는 방법으로 대체되었다.

어쨌든 제1형 당뇨병에 대한 현재까지의 가장 강력한 치료방법은 췌도이식이다. 하지만 췌도이식이 모든 당뇨병 환자에게 제공될 수 있는 routine 시술이 되기에는 장기 공여자의 부족과 이식 후 췌도의 저조한 생존률이 약점으로 나타났다. 실제 제1형 당뇨병 발병율은 인구 10만명당 약 1.5명으로 매년 600명 정도의 환자가 발병하며, 비전형적이나 심한 인슐린 결핍을 보이는 제2형 당뇨병 환자를 포함시키면 매년 이식이 필요한 환자가 천여 명이 될 것으로 추산할 수 있다. 그렇지만 한국인의 장기공여율은 월별 10건 이하로 매우 부족한 상황이며, 따라서 이식할 수 있는 췌도를 안정적으로 확보할 수 있는 방법의 모색이 향후 췌도이식이 임상적으로 유용한 술기로 자리매김할 수 있는지 좌우하는 중요한 인자로 사료되고 있다. 또 면역거부반응은 크게 다음 3가지 부류로 분류된다. 첫째, 이식전 남아있던 자가반응성 T림프구의 reactivation (autoimmune response), 둘째, 조직적합성 항원등 동종이형 이식에 따른 면역체계의 활성화(alloreactivity), 셋째, 활성화된 면역세포들로부터 유래된 cytokine 등에 의한 nonspecific immune response 등이다. 면역거부 반응을 막기 위해 이식 전, 그리고 이식 후 평생 동안 고농도의 면역억제제를 투여하게 되는데, 비특이적인 면역억제제의 투여는 인슐린 분비를 저해하기도 하고, 인슐린저항성을 심화시켜 그 자체

만으로 당뇨병성 만성 합병증에 못지않은 상당한 부작용을 유발하는 것으로 알려지고 있다. 또한 투여에 필요한 비용 역시 월당 30~60만원의 고비용이 필요하여 이를 대체할 치료법이 절실하다. 이와 같이 2000년도에 Edmonton 이식법⁵이 성공적으로 이루어진 후에 전 세계적으로 많은 췌도이식 수술이 이루어지고 있지만 해결해야 될 문제는 많다. 장기 공여자의 부족은 줄기세포를 이용하여 췌도 세포와 비슷한 성격을 갖는 세포를 분화시키기 위해 노력하고 있다.⁴⁰ 이와 동시에 이식된 췌도세포의 생존률과 기능을 향상시키기 위한 노력 또한 이루어지고 있으며, 이에 대한 방법으로는 NF- κ B 억제제나 caspase inhibitor와 같은 anti-apoptosis 물질을 처리하는 방법⁴¹을 비롯하여 혈관내피세포 성장인자(VEGF)⁴²나 간세포 성장인자(HGF)⁴³를 사용하는 방법 등이 있다. 하지만 지금까지 면역반응을 효율적으로 억제시킨 방법은 없었으며, 단지 donor 줄기세포와 같은 hematopoietic 줄기세포 이식을 통해 면역세포 chimerism을 유도하여 면역관용을 유도하려는 시도만이 앞으로 기대할 시도로 알려지고 있다.⁴⁰ 본 저자들은 heparin-결합 transforming growth factor β (TGF β) 국소전달시스템의 개발을 통해 면역반응을 효율적으로 제어하고 췌도의 생존율과 기능을 향상시키고자 노력하고 있다. 이미 TGF β 유전자 치료를 통해 췌도의 apoptosis를 감소시키고 조절 T림프구 유도를 통해 말초 면역관용이 유도됨을 확인한 바 있으며,⁴⁴ 이러한 치료의 연장선상에서 TGF β 국소전달이 이식 후 거부(rejection) 현상을 극복할 수 있는지 연구하고 있다. 이미 여러 growth factor를 포함하고 있는 platelet rich plasma (PRP)와 강력한 혈관신생성 효과를 갖는 fibroblast growth factor (FGF)를 heparin에 결합시켜 fibrin gel로 췌도를 보호하고자 하는 시도는 성공하였다. 본 연구자들은 FGF, TGF β , PDGF 등 여러가지 성장인자의 healing capacities와 gel의 modeling capacity 간의 시너지 효과를 확인하였다.

4. 소도 대체요법과 인공 베타세포의 유도

소도 대체요법으로 i) 유전자 치료법 없는 세포치료(cell based therapy), ii) 유전자 치료법을 이용한 세포치료, iii) 재생요법(regenerative therapy) 등이 있다. 췌도이식원 공여자 수의 제한을 해결하기 위해 유전자 치료법 없는 고식적 세포치료가 협의의 세포치료라면, 무한정량 세포 공급원을 확보하기 위해 유전자 치료법을 이용하여 베타세포

주를 만들고자 하는 노력이 또한 소도 대체요법의 중요한 부분이다. 그렇지만 실험동물에 배양된 베타세포주를 이식했을 경우 세포내에 내재된 종양발생유전자로 인해 종양이 발생하는 부작용이 발견되었다. 또 인슐린 유전자를 정상세포에 전달하여 인슐린 분비 세포를 만드는 유전자치료가 많이 시도되었고 단점을 극복하기 위해 변형시킨 인슐린 유전자를 사용하거나 또 인슐린 생산을 조절하기 위해 포도당에 반응하는 promotor를 사용하기도 했으나, 시시각각 변동하는 혈당을 조절하기에는 미흡하였다. 따라서 완벽한 인슐린 분비 조절기구를 갖는 베타세포를 재생하려는 ‘재생요법’이 최근 주목을 받고 있다. 재생요법의 방법으로는 i) 실험실 시험관내(in vitro), 생체외(ex vivo), 생체내(in vivo) 재생요법의 3가지 범주로 나눌 수 있다. 시험관내 재생요법은 이미 확립된 베타세포주나 배아줄기세포(embryonic stem cell) 및 조직특이적 성체줄기세포(somatic stem cell)에서 유래된 분화된 세포를 생체에 이식하는 방법이며, 대부분 면역억제제를 병용하여야 한다. 생체외 재생요법은 환자 자신의 줄기세포를 획득하여 체외에서 베타세포로 분화를 유도한 뒤 다시 환자에게 이식하는 방법으로 면역억제제를 쓰지 않아도 되는 장점이 있다. 생체내 재생요법은 손상된 조직을 환자 몸 안에서 재생을 유도하거나 줄기세포로부터 새롭게 분화를 유도하는 방법으로 약물요법 및 유전자 치료법을 사용하여 시행할 수 있다. 특히 최근 생체내 재생요법으로 췌도 발생에 필요한 전사 유전자를 유전자 전달 벡터를 통해 생체의 줄기세포에 전달하여 분화된 완전한 세포를 얻고자 하는 노력이 각광을 받고 있다. 또 인공 베타세포(surrogate β cell)란 다양한 종류의 세포로 분화가 가능한 줄기세포를 이용하여 췌도의 발생 및 분화에 필수적인 유전자를 발현 또는 도입시켜 인슐린 분비세포로 분화를 유도하는 것을 의미한다. 최근 Ferber 등은 PDX-1 유전자를 바이러스를 이용하여 당뇨병이 유발된 생쥐의 간에 전달하여 혈당강하를 관찰한 바 있는데, 생쥐의 간에서 추출한 mRNA에서 췌장 베타세포에서 볼수 있는 인슐린 유전자 발현 및 파라핀 조직에서 면역염색으로 인슐린을 검출한 바 있다.⁴⁵ 그 이후 Kojima 등은 면역반응이 적은 바이러스를 이용하여 PDX-1 유전자를 줄기세포에 전달한 결과 췌장 내분비 세포로 분화된 뿐 아니라 외분비 세포로의 분화도 촉진됨을 발견하였고, 이 결과 생성된 trypsin이 심한 간손상을 유발하였고, 또 분화된 인슐린 분비세포도 파괴함을 관찰하였다.⁴⁶ 한편 소도세

포 발달에 중요한 Neuro D/Beta 2 유전자 및 소도 성장 촉진 유전자인 betacellulin을 당뇨병이 유발된 생쥐에 동시에 전달하여 4개월간 혈당이 조절됨을 보고하였는데, 간 조직에서 인슐린 분비 세포 및 소도로의 분화를 관찰하였다. 분화된 소도에는 인슐린 뿐 아니라 글루카곤, 또 소마토스테틴 등이 관찰되었다.⁴⁷ 최근 베타세포 특이성 전사인자들의 상호 보완적인 작용이 인슐린 유전자 활성화에 상승적으로 작용한다는 보고가 알려지고 있는데, 이에 따라 2~3 가지 전사인자 유전자를 동시에 전달한다면 보다 효과적인 내분비 분비세포로 분화를 유도할 가능성이 시사되고 있다. 실제로 PDX-1, NGN3 및 Neuro D 등을 당뇨병 생쥐에 단독 및 병용 투여한 결과 병용투여한 경우 혈당조절 및 인슐린 유전자 활성화에 효과적인 것을 관찰하였다.⁴⁸

결론

최근 국내 인구 중 노인층의 비율이 늘어나고, 서구화된 식습관으로 인하여 비만환자가 늘어남에 따라 당뇨병 발병이 급격히 늘어가는 추세이다. 비만에 따른 고지혈증, 고혈압, 심혈관질환, 만성 사구체 신증 등의 성인병 환자가 증가하고 있다. 제1형 당뇨병에서 cytokine 유전자 치료나 항산화제 펩티드 치료에 의한 베타세포의 생존율을 높임으로써 발병 시기를 늦출 수 있을 것으로 예상된다. 제2형 당뇨병에서 고혈당에 오랫동안 노출될 때 산화적 스트레스가 증가하는데 항산화제에 의한 당뇨병 만성합병증을 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다. 최근에는 서방형 펩티드 국소전달체계의 개발에서 보는 바와 같이 세포내 유입을 원활하게 할 뿐 아니라, 비교적 오랫동안 베타세포 생존을 도모할 수 있으며 면역관용을 도모할 수 있는 치료도 가능하게 되었다. 투여 시 높은 효율을 얻을 수 있고 이에 따라 중요한 발병시기 동안 베타세포 mass를 유지할 수 있다면, 치료상에 효과를 극대화 할 수 있을 것이다. 이러한 치료는 cytokine 이나 항산화제 이외의 다른 단백질의 세포내 유입을 유도함으로써 새로운 신약 개발에 응용될 수 있을 가능성이 무궁무진할 것으로 예상된다. 당뇨병은 현재로서는 완치할 수 없는 만성질환이며, 인슐린 투여에 의해 정상에 가까운 혈당 조절만이 당뇨병성 만성 합병증을 예방할 수 있다. 하지만 인슐린과 더불어 이러한 치료법과 동반된 췌도이식으로 동시에 세포치료가 가능할 수 있다면, 혈당 조절뿐만 아니라 당뇨

병 만성합병증 예방을 더욱 효과적으로 할 수 있을 것으로 기대된다. 이와 같은 방법으로 이식된 췌도세포의 초기 생존율이 향상된다면 이를 바탕으로 다양한 줄기세포 유래 췌도 세포의 개발과 함께 췌도 세포의 불멸화 과정을 통한 안정적인 췌도 세포의 공급원 연구에도 박차를 가하게 될 것으로 생각된다. 최종적으로 현재 인슐린 투여를 통해 혈당 수치를 유지 시키고 있는 수많은 당뇨병 환자들이 고통에서 해방되는 결과를 예상할 수 있다.

References

1. Polonsky KS, Sturis J, Bell GI. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 1996;334:777-83.
2. Kahn SE. The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86: 4047-58.
3. Marchetti P, Del Prato S, Lupi R, Del Guerra S. The pancreatic β -cell in human type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:S3-6.
4. Bonner-Weir S, Weir G. Five stages of evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 2004;53:S16-S21.
5. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbitt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006;355:1318-30.
6. Stefan Y, Orci L, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Patel Y, Unger RH. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* 1982;31:694-700.
7. Rahier J, Goebbels RM, Henquin J. Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* 1983;24:366-71.
8. Sempoux C, Guiot Y, Dubois D, Moulin P, Rahier J. Human type 2 diabetes: morphological evidence for an abnormal β -cell function. *Diabetes* 2001;50:S172-S7.
9. Donath MY, Ehses JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, Reinecke M. Mechanisms of β -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes* 2005;54: S108-S13.
10. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in β -cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 2003;52:581-7.
11. Efanova IB, Zaitsev SY, Zhivotovsky B, Kohler M, Efendic S, Orrenius S, Bergpen PO. Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells: a process dependent on intracellular Ca^{2+} concentration. *J Biol Chem* 1998;273: 33501-607.
12. Marchetti P, Guerra SD, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, Bugliani M, Boggi U, Vistoli F, Mosca F, Prato SD. Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5535-41.
13. Zeender E, Maedler K, Bosco D, Berney T, Donath MY, Halban PA. Pioglitazone and sodium salicylate protect human β -cells against apoptosis and impaired function induced by glucose and interleukin-1 β . *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5059-66.
14. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983;94: 407-11.
15. Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989;70: 737-57.
16. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992;257:1220-4.
17. Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide

- anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001;353: 411-6.
18. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 2007;43:477-503.
 19. Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007;9: 343-53.
 20. Coughlan MT, Thorburn DR, Penfold SA, Laskowski A, Harcourt BE, Sourris KC, Tan AL, Fukami K, Thallas-Bonke V, Nawroth PP, Brownlee M, Bierhaus A, Cooper ME, Forbes JM. RAGE-Induced Cytosolic ROS Promote Mitochondrial Superoxide Generation in Diabetes. *J Am Soc Nephrol* (in press).
 21. Ha H, Hwang IA, Park JH, Lee HB. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82:S42-S5.
 22. Li X, Chen H, Epstein PN. Metallothionein and catalase sensitize to diabetes in nonobese diabetic mice: reactive oxygen species may have a protective role in pancreatic β -cells. *Diabetes* 2006;55:1592-604.
 23. Lortz S, Tiedge M, Nachtwey T, Karlens AE, Nerup J, Lenzen S. Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. *Diabetes* 2000; 49:1123-30.
 24. Hohmeier HE, Thigpen A, Tran VV, Davis R, Newgard CB. Stable expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in insulinoma cells prevents IL-1 β -induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J Clin Invest* 1998;101:1811-20.
 25. Heineke EW, Johnson MB, Dillberger JE, Robinson KM. Antioxidant MDL 29,311 prevents diabetes in nonobese diabetic and multiple low-dose STZ-injected mice. *Diabetes* 1993;42:1721-30.
 26. Piganelli JD, Flores SC, Cruz C, Koepp J, Batinic-Haberle I, Crapo J, Day B, Kachadourian R, Young R, Bradley B, Haskins K. A metalloporphyrin-based superoxide dismutase mimic inhibits adoptive transfer of autoimmune diabetes by a diabetogenic T-cell clone. *Diabetes* 2002;51:347-55.
 27. Olcott AP, Tocco G, Tian J, Zekzer D, Fukuto J, Ignarro L, Kaufman DL. A salen-manganese catalytic free radical scavenger inhibits type 1 diabetes and islet allograft rejection. *Diabetes* 2004;53:2574-80.
 28. Bottino R, Balamurugan AN, Bertera S, Pietropaolo M, Trucco M, Piganelli JD. Gene transfer of manganese superoxide dismutase extends islet graft function in a mouse model of autoimmune diabetes. *Diabetes* 2003;52:387-93.
 29. Li X, Chen H, Epstein PN. Metallothionein protects islets from hypoxia and extends islet graft survival by scavenging most kinds of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2004;279: 765-71.
 30. Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J, Miyazaki J. Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and anti-apoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J Exp Med* 1998;188:1445-51.
 31. Vasak M, Hasler DW. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol* 2000;4: 177-83.
 32. Miura T, Muraoka S, Ogiso T. Antioxidant activity of metallothionein compared with reduced glutathione. *Life Sci* 1997;60:301-9.
 33. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999;285: 1569-72.
 34. Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* 1998;8:84-7.
 35. Mann DA, Frankel AD. Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J* 1991;10:1733-9.
 36. Moy P, Daikh Y, Pepinsky B, Thomas D, Fawell S, Barsoum J. Tat-mediated protein delivery can facilitate MHC class I presentation of antigens. *Mol Biotechnol*

- 1996;6:105-13.
37. Kim DT, Mitchell DJ, Brockstedt DG, Fong L, Nolan GP, Fathman CG, Engleman EG, Rothbard JB. Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide. *J Immunol* 1997; 159:1666-8.
 38. Embury J, Klein D, Pileggi A, Ribeiro M, Jayaraman S, Molano RD, Fraker C, Kenyon N, Ricordi C, Inverardi L, Pastori RL. Proteins linked to a protein transduction domain efficiently transduce pancreatic islets. *Diabetes* 2001;50:1706-13.
 39. Del Gaizo V, MacKenzie JA, Payne RM. Targeting proteins to mitochondria using TAT. *Mol Genet Metab* 2003;80:170-80.
 40. Madsen OD. Stem cells and diabetes treatment. *APMIS* 2005;113:858-75.
 41. Su D, Zhang N, He J, Qu S, Slusher S, Bottino R, Bertera S, Bromberg J, Dong HH. Angiotensin-1 production in islets improves islet engraftment and protects islets from cytokine-induced apoptosis. *Diabetes* 2007;56:2274-83.
 42. Brissova M, Shostak A, Shiota M, Wiebe PO, Poffenberger G, Kantz J, Chen Z, Carr C, Jerome WG, Chen J, Baldwin HS, Nicholson W, Bader DM, Jetton T, Gannon M, Powers AC. Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes* 2006;55:2974-85.
 43. Garcia-Ocana A, Takane KK, Reddy VT, Lopez-Talavera JC, Vasavada RC, Stewart AF. Adenovirus-mediated hepatocyte growth factor expression in mouse islets improves pancreatic islet transplant performance and reduces beta cell death. *J Biol Chem* 2003;278:343-51.
 44. Park LJ, Lee EJ, Lee SK, Lim MS, Hong HK, Shin GW, Park Y. TGF β plasmid construction and delivery for the prevention of type 1 diabetes. *Ann NY Acad Sci* 2008;1150:311-5.
 45. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seiffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 2000;6:568-72.
 46. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Nakahara T, Hara M, Chan L. Extrapancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2458-63.
 47. Shin S, Li N, Kobayashi N, Yoon JW, Jun HS. Remission of diabetes by beta-cell regeneration in diabetic mice treated with a recombinant adenovirus expressing betacellulin. *Mol Ther* 2008;16:854-61
 48. Song YD, Lee EJ, Yashar P, Pfaff LE, Kim SY, Jameson JL. Islet cell differentiation in liver by combinatorial expression of transcription factors neurogenin-3, BETA2, and RIPE3b1. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354:334-9.